

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460684

研究課題名(和文) 胃癌細胞における放射性ヨード治療の可能性の基礎的検討

研究課題名(英文) Induction and Enhancement of Iodide Transporter Expression in Gastric Cancer Cells

研究代表者

小飼 貴彦 (KOGAI, Takahiko)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40711693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヨードトランスポーター NIS は、甲状腺のほか、乳癌や胃癌でも発現しており、腫瘍組織での発現増強は腫瘍を標的とした放射性ヨード治療の可能性を示唆する。われわれは胃癌細胞株 MKN45 において、核内受容体RXR の刺激により NISの発現が誘導されること、AKT阻害剤によりその効果が増強されることを見出した。さらに、タンパク質合成阻害剤によるNIS発現誘導作用を見出し、2種のNIS発現誘導剤(レチノイドおよびタンパク質合成阻害剤)がもたらす miRNA発現プロファイルの変化について検討した結果、新たなNIS遺伝子発現増強剤の候補を確定した。

研究成果の概要(英文)：The iodide transporter, NIS, is abundantly expressed in thyroid, as well as breast cancer and gastric cancer. Tumor-specific enhancement of its expression would make it possible to apply radio-iodide to target the tumors. We found significant induction of NIS expression by RXR agonists, and its enhancement by AKT inhibitors, in an in vitro model of gastric cancer. A number of translation inhibitors also induced the NIS expression in several cancer cell lines. Comprehensive analysis of miRNA expression in those cells suggested some miRNAs as potential NIS stimulators.

研究分野：内分泌学

キーワード：ヨードトランスポーター レチノイド 胃癌

### 1. 研究開始当初の背景

放射線ヨード治療は、甲状腺癌治療に汎用され、その有効性が確立されている。Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter (NIS) は哺乳類細胞において最も効率の良いヨード・トランスポーターであり、甲状腺癌をはじめとする癌細胞で特異的に発現すれば、放射性ヨードの取り込みと腫瘍の縮小をもたらす。

当初、NIS は甲状腺ホルモンの合成に必要なヨードを血液中から甲状腺細胞に取り込むトランスポーターとして同定されたが、その後、授乳中の乳腺、胃粘膜、唾液腺などにも発現していることが示された<sup>(1)</sup>。

放射性ヨード治療は、通常甲状腺全摘後の残存あるいは転移甲状腺癌組織がターゲットとされ、事前にリコンビナント TSH 投与などにより癌細胞の NIS の発現を最大にした状態で施行される。われわれは、乳癌細胞株 MCF7 でビタミン A (レチノイド) 誘導体であるトランス・レチノイン酸 (tRA) による内因性 NIS の転写誘導およびヨード取り込み能の誘導を見出し<sup>(2)</sup>、さらに PI3 キナーゼ - AKT 経路の阻害が、おそらく mRNA の安定化と NIS タンパク質の膜への移動の促進を介してヨード取り込みを増強することを報告している<sup>(3)</sup>。さらに、予備実験で、乳癌だけではなく、胃癌細胞もレチノイン酸にตอบสนองして NIS 遺伝子 (NIS) を発現することを見出していた。胃癌では約 3 割の症例で NIS の発現が認められる。

### 2. 研究の目的

本研究は、上記予備実験の結果を受け、本邦に多い胃癌を対象とし、胃癌細胞において内因性 NIS の発現誘導、およびその最適化を試み、放射性ヨード治療の胃癌への応用の可能性を検討するものである。研究項目は、主に培養胃癌細胞モデル (MKN45) を利用し、(1) レチノイドによる NIS 発現誘導メカニズムの検索、(2) 細胞内シグナル経路阻害剤による NIS 発現増強効果の比較検討、(3) AKT 阻害剤による NIS の細胞膜上への発現に対する効果の検討、(4) 3次元培養条件下での NIS 発現誘導の検討、に加え、(5) 蛋白合成阻害剤の NIS 発現に対する効果の評価、である。さらに、当初これらの *in vitro* での検討結果を踏まえ、(6) 胃癌モデルマウスの確立と NIS 発現誘導、(7) 初代培養細胞の確立と NIS 発現誘導の検討、が目標とされた。

### 3. 研究の方法

(1) レチノイドによる NIS 発現誘導メカニズムの検索、(2) 細胞内シグナル経路阻害剤の NIS 発現増強効果の比較検討

MKN45 細胞株を胃癌細胞モデルとして、またレチノイドにตอบสนองし内因性 NIS を発現する乳癌細胞株 MCF7 を比較のために、それぞれ使用した。レチノイド受容体を介する NIS 発現

制御の検討には、薬理学的手法を適用した。さらに、当研究開始後、NIS 発現調節における miRNA の重要性が示唆されたため、当院研究支援センターに設置された Ion Proton システムを用いて網羅的に miRNA 発現プロファイリングを行なった。なお、合成レチノイドは影近弘之博士 (東京医科歯科大学生体材料工学研究所) より供与いただいた。

### (3) AKT 阻害剤による NIS の細胞膜上の発現に対する効果の検討

予備実験にてヒト NIS タンパク質を再現よく検出できる抗体が得られなかったため、NIS の局在の検討には、GFP タグを付加した外因性 NIS の強制発現系を用いた。細胞膜表面に分布する NIS の検出には、ビオチンラベル法を利用した。

### (4) 3次元培養条件下での NIS 発現誘導の検討

アガロース上でのスフェロイド培養、および低接着性高分子ポリマーを利用した足場型 3次元培養システムを利用した。

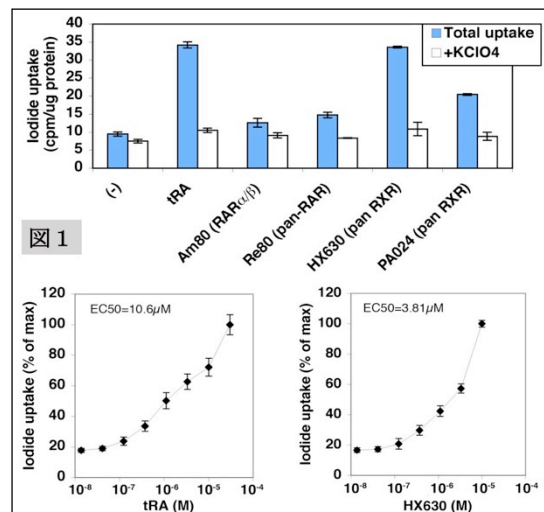
なお、当初は(1)(2)(4)の結果を受けて、(5)胃癌モデルマウスの確立と NIS 発現誘導、(6)初代培養細胞の確立と NIS 発現誘導の検討、を施行の予定だったが、(4)の結果の再現性が確認されないこと、および時間的・費用的な理由から、これらは施行されなかった。

### 4. 研究成果

(1) レチノイドによる NIS 発現誘導メカニズムの検索

#### ① NIS 発現誘導シグナルを介するレチノイド受容体の同定

細胞内におけるレチノイドの転写促進作用は、それらがリガンドとして主に 2 種の核内受容体 (レチノイン酸受容体 RAR および 9-*cis* レチノイン酸受容体 RXR) を刺激する



ことによりもたらされる。そこで、それぞれのレチノイド受容体 (RAR, RXR) に特異的なアゴニスト (合成レチノイド) を MKN45 細胞に作用させ、NIS の発現誘導効果について評価したところ、NIS mRNA 発現誘導、ヨード取り込み増加作用 (図 1) とともに、RXR の刺激が重要であることが示された。RXR アゴニスト HX630 の NIS 発現誘導のための有効濃度 ( $EC_{50}=3.81\mu\text{M}$ ) は、細胞内で RXR リガンドに変換され効果を表す tRA の約 1/3 だったが、最大の NIS 誘導効果は、レチノイン酸と同様、中等度 (陰性コントロールに比べて 3 倍程度) であった。乳癌細胞 MCF7 におけるレチノイドによる NIS 発現誘導には RAR への刺激が重要<sup>(4)</sup>であり、胃癌細胞と乳癌細胞における発現誘導機序の相違が明らかとなった。

## ② タンパク質合成阻害剤による NIS 発現誘導

レチノイドによる NIS 発現誘導効果のメカニズム検索を行うため、*de novo* タンパク質合成の関与についての評価を目的として、胃癌細胞株に蛋白質合成阻害剤であるサイクロヘキシミド (CHX) 処理を行った。興味深いことに、CHX 単独の処理でも NIS 遺伝子発現の有意な増強が観察されたため、胃癌以外の数種の癌細胞株 (乳癌、肺癌、甲状腺癌、前立腺癌) で同様の作用が見られるか確認したところ、いずれの細胞株においても NIS mRNA の有意な発現増強 (9 倍~222 倍) が認められた (図 2)。他の蛋白質合成阻害剤 (ピューロマイシンなど) でも同様の誘導が見られ、NIS の発現誘導は、CHX のオフターゲット効果ではなく、蛋白質合成の阻害そのものによることが強く示唆された。さらに CHX の作用は複数の p38 MAP キナーゼ阻害剤でほぼ完全に抑制され、乳癌細胞におけるレチノイド<sup>(5)</sup>と同様に p38 の関与が示された。

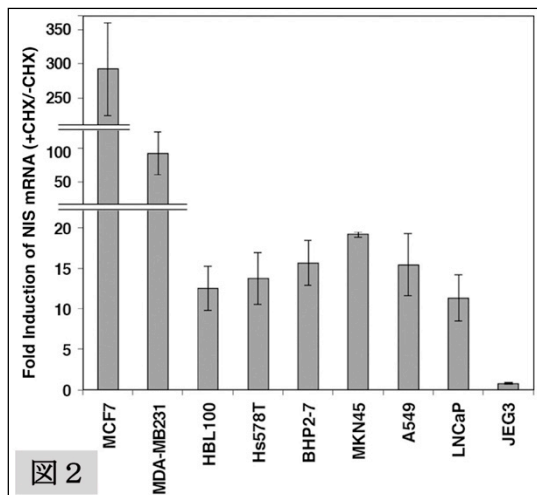
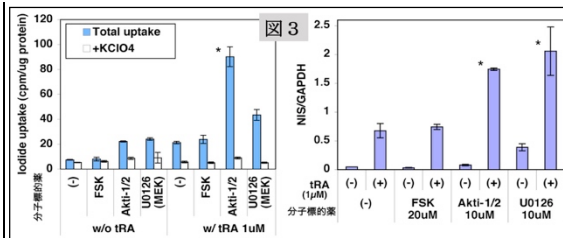


図 2 (2) 細胞内シグナル経路阻害剤の NIS 発現増強効果の比較検討



MKN45 におけるレチノイドによるヨード取り込みの増加は 3 倍程度と小さかったが、甲状腺細胞でヨード取り込みを増強する AKT 阻害剤<sup>(3)</sup>や MEK 阻害剤を添加したところ、それぞれ 12 倍、6 倍に増強された (図 3 左)。一方 NIS mRNA は AKT 阻害剤、MEK 阻害剤の添加で同レベルの誘導 (図 3 右) となっており、AKT 阻害剤の NIS 翻訳後効果が示唆された。一方、甲状腺細胞で著明な NIS 発現誘導効果を示す cAMP アゴニスト<sup>(6)</sup>は、MKN45 では効果を示さなかった。ここで、NIS 誘導に必要な AKT 阻害剤の濃度はおおむね  $10^{-5}\text{M}$  であり、小さいとは言えなかった。そこで AKT に対する有効濃度  $IC_{50}$  値がより低い TORC 阻害剤を試したところ、NIS 誘導増強のための  $EC_{50}$  を 1/10 まで下げることができた。生体内で高濃度のレチノイドは重篤な副作用の原因となるが、今回の細胞実験で、TORC 阻害剤の添加により、合成レチノイドの  $EC_{50}$  も合わせて 1/10 程度まで下げることができた。

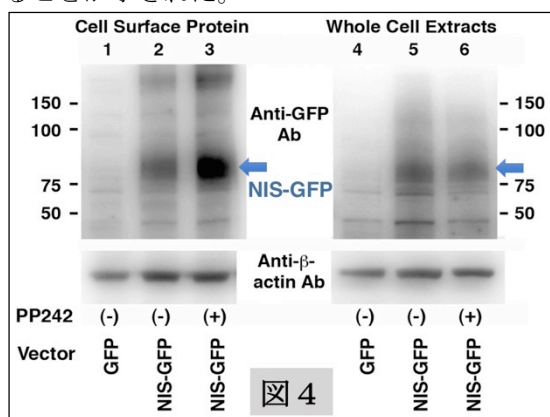
## ③ NIS 発現誘導シグナルの miRNA 発現プロフィールへの効果

最近 NIS 遺伝子発現の miRNA による調節に関する報告があいついで発表されている<sup>(7-9)</sup>。レチノイドは数多くの miRNA の発現を調節しており<sup>(10)</sup>、NIS 発現誘導における転写調節以外の機序の関与も示唆されている<sup>(1)</sup>。そこで、miRNA が胃癌や乳癌での NIS 発現誘導に関与するか検討すべく、本研究申請後に新たに当施設に導入された次世代シーケンサーによる網羅的 small RNA 解析を施行した。その結果、レチノイド刺激あるいはタンパク質合成阻害剤で有意に発現促進ないし抑制される miRNA 種を、MKN45 で 12、MCF7 で 20 同定した。両細胞株で同様に発現制御される miRNA も複数同定されており、今後 NIS 遺伝子発現制御における役割や、放射性ヨード治療の増強剤としての可能性につき、検討していく必要があると考えられた。

### (3) AKT 阻害剤の NIS の細胞膜上の発現に対する効果の検討

(2) で AKT 阻害剤の翻訳後効果が示唆されたため、GFP タグ標識した NIS を強制発現させたサル腎細胞株 COS7 を用いて検討を行った。すなわち、細胞表面に発現した蛋白質の分画をビオチン化により分離し、ウェスタン・ブロッティングにより細胞表面上の

NIS-GFP 融合タンパク質の発現量を評価したところ、AKT 経路阻害剤 (PP242) 添加により、3 倍程度の細胞表面の NIS-GFP の発現増加が観察された (図 4)。これにより NIS の細胞表面への輸送促進に AKT-TORC 経路が関係することが示された。



#### (4) “3 次元培養条件下での NIS 発現誘導の検討”

アガロース上でのスフェロイド培養<sup>(11)</sup>を試みたが、MKN45 細胞では再現よく 3 次元培養できなかったため、低接着性高分子ポリマーを利用した足場型 3 次元培養システムを利用した。しかし、本研究期間中にレチノイド刺激に対する NIS 発現誘導について再現性のある結果は得られず、細胞の継代数との関連などを検討中である。

#### (5) まとめ

胃癌細胞株 MKN45 において、核内受容体 RXR の刺激により NIS 発現が誘導されること、AKT 阻害剤によりその効果が増強されることを見出した。これらは既報の乳癌細胞における NIS 発現誘導とは別の機序によるものと考えられた。さらに AKT 阻害剤は NIS の細胞表面への輸送も促進し、胃癌細胞におけるヨード取り込み促進作用に寄与していることが示唆された。RXR 特異的アゴニストと TORC 阻害剤の組み合わせにより、最小の EC<sub>50</sub> を観察した。一方、タンパク質合成阻害剤による NIS 発現誘導作用を偶然見出し、さらに 2 種の NIS 発現誘導剤 (レチノイドおよびタンパク質合成阻害剤) がもたらす miRNA 発現プロファイルの変化について検討し、新たな NIS 発現増強剤の候補を確定した。

#### (引用文献)

1. Kogai, T., and Brent, G. A. (2012) *Pharmacol Ther* **135**, 355-370
2. Kogai, T., Schultz, J. J., Johnson, L. S., Huang, M., and Brent, G. A. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8519-8524
3. Kogai, T., Sajid-Crockett, S., Newmarch, L. S., Liu, Y. Y., and Brent, G. A. (2008) *J Endocrinol* **199**, 243-252
4. Kogai, T., Kanamoto, Y., Li, A. I., Che, L. H., Ohashi, E., Taki, K., Chandraratna, R. A., Saito, T., and Brent, G. A. (2005) *Endocrinology* **146**, 3059-3069
5. Kogai, T., Liu, Y. Y., Mody, K., Shamsian, D. V., and Brent, G. A. (2012) *J Biol Chem* **287**, 3292-3300
6. Kogai, T., Endo, T., Saito, T., Miyazaki, A., Kawaguchi, A., and Onaya, T. (1997) *Endocrinology* **138**, 2227-2232
7. Lakshmanan, A., Wojcicka, A., Kotlarek, M., Zhang, X., Jazdzewski, K., and Jhiang, S. M. (2015) *Endocr Relat Cancer* **22**, 11-21
8. Li, L., Lv, B., Chen, B., Guan, M., Sun, Y., Li, H., Zhang, B., Ding, C., He, S., and Zeng, Q. (2015) *Biochem Biophys Res Commun* **462**, 314-321
9. Riesco-Eizaguirre, G., Wert-Lamas, L., Perales-Paton, J., Sastre-Perona, A., Fernandez, L. P., and Santisteban, P. (2015) *Cancer Res* **75**, 4119-4130
10. Nervi, C., and Grignani, F. (2014) *Subcell Biochem* **70**, 151-179
11. Kogai, T., Curcio, F., Hyman, S., Cornford, E. M., Brent, G. A., and Hershman, J. M. (2000) *J Endocrinol* **167**, 125-135

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① De Grande LAC, Van Uytfganghe K, Reynders D, Das B, Faix JD, MacKenzie F, Decallonne B, Hishinuma A, Lapauw B, Taelman P, Van Crombrugge P, Van den Bruel A, Velkeniers B, Williams P, Thienpont LM: Standardization of Free Thyroxine Measurements Allows the Adoption of a More Uniform Reference Interval. *Clin Chem* 63: 1642-52. DOI:10.1373/clinchem.2016.269456
- ② Thienpont LM, Van Uytfganghe K, De Grande LAC, Reynders D, Das B, Faix JD, MacKenzie F, Decallonne B, Hishinuma A, Lapauw B, Taelman P, Van Crombrugge P, Van den Bruel A, Velkeniers B, Williams P: Harmonization of Serum Thyroid-Stimulating Hormone Measurements Paves the Way for the

Adoption of a More Uniform Reference Interval. Clin Chem 63: 1248-60.

DOI:10.1373/clinchem.2016.269456

- ③ Nishihara E, Hishinuma A, Kogai T, Takada N, Hirokawa M, Fukata S, Ito M, Yabuta T, Nishikawa M, Nakamura H, Amino N, Miyauchi A: A Novel Germline Mutation of KEAP1 (R483H) Associated with a Non-Toxic Multinodular Goiter. Front Endocrinol 2016 Sep 20; 7: 131. DOI:10.3389/fendo.2016.00131
- ④ Mizokami T, Fukata S, Hishinuma A, Kogai T, Hamada K, Maruta T, Higashi K, Tajiri J: Iodide Transport Defect and Breast Milk Iodine. Eur Thyroid J 5: 145-8. DOI:10.1159/000446496
- ⑤ Taki K, Kogai T, Sakumoto J, Namatame T, Hishinuma A: Familial hypocalciuric hypercalcemia with a de novo heterozygous mutation of calcium-sensing receptor. Endocrinol Diabetes Metab Case Rep. 2015:150016. DOI:10.1530/EDM-15-0016.
- ⑥ Nishihara E, Fukata S, Hishinuma A, Amino N, Miyauchi A: Prevalence of thyrotropin receptor germline mutations and clinical courses in 89 hyperthyroid patients with diffuse goiter and negative anti-thyrotropin receptor antibodies. Thyroid 24:789-95. DOI:10.1089/thy.2013.0431.
- ⑦ 小飼貴彦、廣川満良、福島光浩、作本順子、小林薫、深田修司、宮内昭、菱沼昭、甲状腺癌における細胞分化マーカー HMGA2 の発現の検討. Thyroid Cancer Explore (査読なし) 1: 139-141

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takahiko Kogai, Mitsuyoshi Hirokawa, Mitsuhiro Fukushima, Junko Sakumoto, Kaoru Kobayashi, Shuji Fukata, Akira Miyauchi, Hideki Hirabayashi, Akira Hishinuma: Expression of a cell differentiation marker HMGA2 in thyroid cancer tissues in Japan. 2017 Asia Oceania Thyroid Association (AOTA) Congress, Busan, Korea.
- ② Takahiko Kogai, Junko Sakumoto, Wataru Konno, Hiroaki Kanaya, Hideki Hirabayashi, Akira Hishinuma: Potential of HMGA2 Immuno-histochemical Staining as a Prognostic Marker of Metastatic Recurrence in Follicular Thyroid Cancer. 2017 Annual Meeting of the

American Thyroid Association, Victoria, Canada.

- ③ 小飼貴彦、Gregory A Brent、菱沼昭: 蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミドによるヨード・トランスポーター NIS の発現誘導. 第 89 回日本内分泌学会学術総会 2016, 京都
- ④ 小飼貴彦、齊藤司、Yan-Yun Liu, 影近弘之、Gregory Brent、菱沼昭: 胃癌細胞におけるヨード・トランスポーター NIS の発現誘導. 第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015, 東京
- ⑤ 濱田勝彦、丸田哲史、溝上哲也、東輝一朗、田尻淳一、深田修司、小飼貴彦、菱沼昭: 家族性非自己免疫性甲状腺機能亢進症 (FNAH) に対する RI 治療. 第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015, 東京
- ⑥ 小飼貴彦、廣川満良、福島光浩、作本順子、小林薫、深田修司、宮内昭、菱沼昭: 甲状腺癌における細胞分化マーカー HMGA2 の発現の検討. 第 57 回日本甲状腺学会学術集会 2014, 大阪.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

(獨協医科大学・教育研究業績書)  
<http://www.dokkyomed.ac.jp/dmu/info/968.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小飼 貴彦 (KOGAI, Takahiko)  
獨協医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40711693

(2) 研究分担者

菱沼 昭 (HISHINUMA, Akira)  
獨協医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40201727

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )